Rev. Écol. Biol. Sol, 1987, **24** (3) : **473-483.**

Interactions plantes-microorganismes et statut énergétique dans la rhizosphère Rôle de la microflore

PAR

F. R. WAREMBOURG et C. ROUMET

Centre L. Emberger, C.N.R.S., B. P. 5051, 34033 Montpellier Cedex, France

Synopsis: Among plant-microorganisms interactions in regard to the energy status, two examples are discussed where the role of microflora may be of importance in the carbon balance of the rhizosphere. 1) The production of growth promoting substances by *Azospirillum b* which enhance root growth. 2) The recycling of respired CO_2 by a PEP carboxylase in the nodules of leguminous plants acting as a carbon, and therefore energy saving process.

Keywords: *Azospirillum b*, CO_2 recycling, Energy Growth substances, Legumes, PEP-carboxylase, Rhizosphere.

INTRODUCTION

L'on sait que, dans l'environnement immédiat des racines des plantes supérieures, « la rhizosphère », les microorganismes sont souvent différents et surtout plus nombreux que dans le reste du sol. Ceci est dû au fait que, d'abord (et on l'oublie souvent), les racines, par leur activité, exercent une action très importante sur leur germination et qu'ensuite, des interactions spécifiques se créent qui conditionnent les activités, la réussite, voire même la survie des partenaires en présence. A ceci s'ajoute la diversité qui entraîne la complexité d'interactions que l'on connaît dans l'environnement rhizosphérique et qui est loin d'être élucidée à ce jour.

Il apparaît cependant que le fait le moins contesté soit que le statut énergétique de la rhizosphère est garanti par les plantes qui, par l'intermédiaire

de leurs racines, assurent le relais entre la source qu'est la photosynthèse et autant de consommateurs que constituent les microorganismes de la rhizosphère (WAREMBOURG & BILLES, 1979).

Le schéma qui suit (Fig. 1) est l'une des multiples représentations des relations énergétiques dans la rhizosphère. Il a été en effet démontré que les racines relâchaient dans le sol des composés carbonés variés qui sont autant de substrats pour la microflore. Il est également reconnu maintenant, que ces substrats ont plusieurs origines : exsudats, sécrétions, mucilages, mucigels, lysats, cellules et tissus desquamés (ROVIRA *et al.*, 1979). Leur nature et leur disponibilité (quantité, rythmes de production) entraînent des conséquences importantes sur l'activité des microorganismes qui en dépendent et sur les modifications du milieu proprement rhizosphérique. Par exemple, de leur diffusibilité, qui est la résultante à la fois de leur nature et du milieu physique dans lequel ils sont libérés (présence ou non d'argiles), dépendra l'étendue de la zone d'influence des racines et, par conséquent, la taille des populations de microorganismes.

A ce schéma très classique, qui a longtemps privilégié et qui privilégie encore l'effet plante dans l'effet rhizosphérique, doit impérativement s'ajouter l'effet des organismes et notamment celui de la microflore sur le statut énergétique. En effet, de nombreuses études ont démontré très clairement que la microflore augmentait considérablement (100 % selon BARBER et MARTIN, 1976) la perte d'assimilats par les racines. On s'est souvent demandé si l'augmentation de ces pertes, dues à la microflore rhizosphérique, constituait un drain

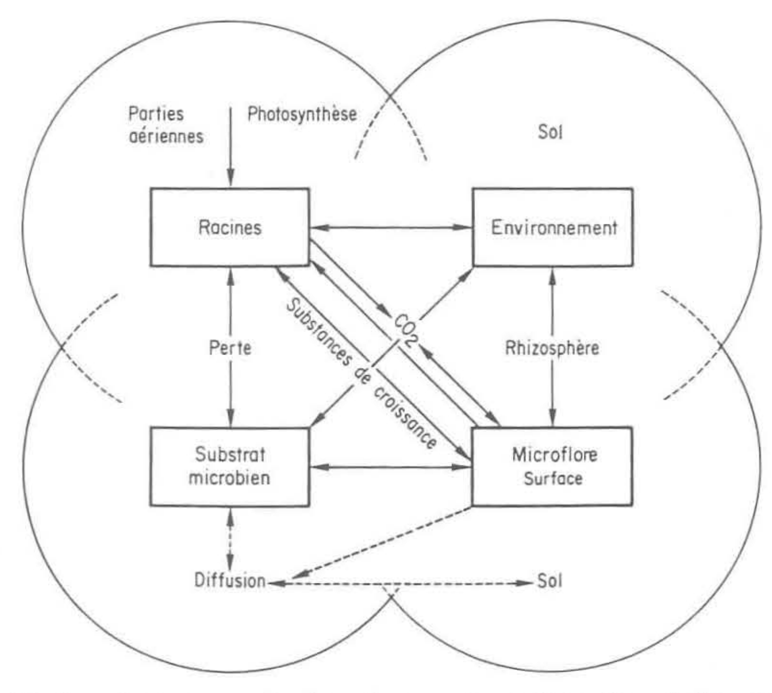


FIG. 1. — Quelques-unes des interactions plantes-microflore-milieu physique au niveau de la rhizosphère des plantes.

tel qu'il réduise la production végétale ou que les plantes pouvaient compenser en photosynthétisant plus. L'étude des symbioses a démontré que, dans la plupart des cas, le bénéfice l'emportait sur les coûts en raison de l'action précise que les microorganismes pouvaient avoir, notamment sur la nutrition minérale de la plante hôte. Deux questions peuvent alors se poser concernant le rôle de la microflore : par quel type d'action augmente-t-elle la perte d'assimilats ? et en quoi peut-elle modifier le fonctionnement des plantes pour l'ajuster à ses besoins ?

En ce qui concerne la première question, de nombreuses réponses ont déjà été apportées. En effet, il a été démontré que l'origine des pertes en assimilats, due à la présence de microorganismes, pouvait être associée soit :

— à une lyse des cellules,

— au maintien d'un fort gradient, par absorption microbienne des exsudats, qui entraîne une forte diffusion hors des racines,

— à la production de composés accroissant la perméabilité cellulaire.

Quant au rôle des microorganismes sur le fonctionnement des plantes dans le sens d'un meilleur bilan énergétique au niveau de la rhizosphère, il existe peu d'informations. Nous l'aborderons à l'aide de deux exemples précis illustrés par des travaux personnels :

— la production de substances de croissance et

— le recyclage d'une partie du CO_2 respiré.

I. — LA PRODUCTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE

Des études entreprises sur l'effet de l'inoculation de blé, avec *Azospirillum brasilense*, étaient destinées à montrer l'action bénéfique d'un apport d'azote par des fixateurs libres sur le rendement des plantes. En fait, si une réponse très nette a été obtenue, elle n'était pas le fait de la fixation asymbiotique d'azote par *Azospirillum brasilense* mais plutôt l'effet de substances de croissance.

A) Matériel et méthodes.

Cette étude effectuée avec du blé d'hiver (*Triticum aestivum* c.v. Fidel), cultivé en pot, et sur des parcelles d'essai, a été répétée deux années consécutives. Dans les deux cas, une comparaison a été faite, entre des plantes inoculées et des plantes témoins. Cette comparaison concernait d'une part : l'évolution de la biomasse carbonée totale, ainsi que de celle de chacun des organes pendant la période de développement des plantes, d'autre part, les variations dans la répartition et l'utilisation des assimilats carbonés. Ces dernières ont été estimées à l'aide de marquages des plantes au $^{14}CO_2$, pendant une journée, à des dates successives pendant la période de végétation. Les détails des techniques ont déjà été publiés (WAREMBOURG *et al.*, 1987). De plus, et par deux fois, des mesures précises de fixation d'azote ont été effectuées par exposition des systèmes racinaires à du $^{15}N_2$ (WAREMBOURG, 1983), pendant 10 jours, de façon à voir si la réponse des plantes à l'inoculum pouvait être due à un apport d'azote supplémentaire.

B) **Résultats et discussion.**

La figure 2 représente l'évolution comparée de la biomasse carbonée des plantes des deux traitements en pots, pour la période allant de la floraison jusqu'à la maturité.

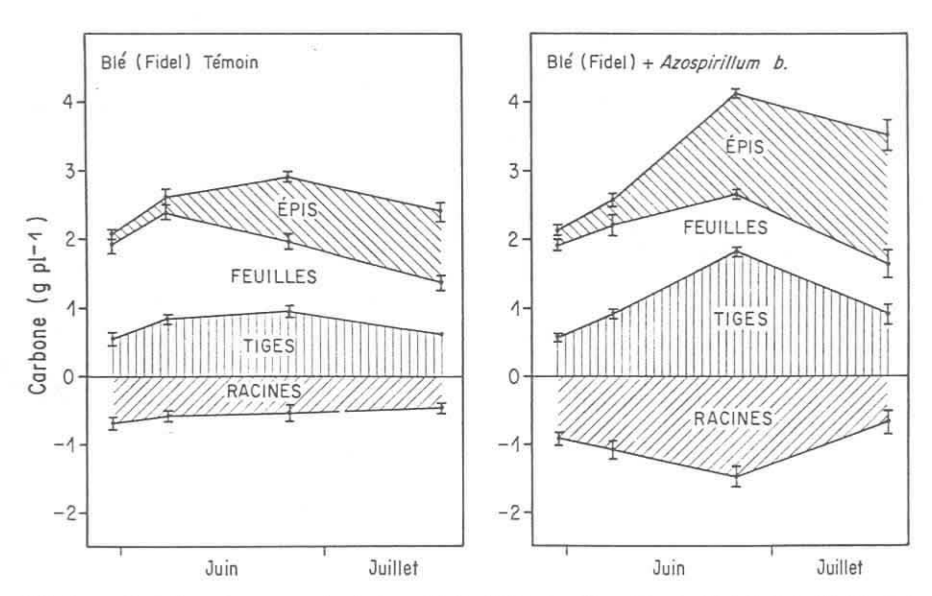


FIG. 2. — Variations au cours du temps de la biomasse des organes de blé inoculé ou non avec A. b.

On constate très nettement un effet de l'inoculation sur la croissance des organes végétatifs, et notamment des racines, dont la biomasse est le double de celle des témoins non inoculés. De plus, il apparaît que cette croissance est prolongée dans le temps (environ 1 mois) sans toutefois compromettre le développement des grains qui se trouve également amélioré.

Les mesures de répartition des assimilats carbonés, effectuées à l'aide de marquage des plantes avec du $^{14}CO_2$, ont permis de confirmer ces résultats. Comme l'indique la figure 3, les racines des plantes inoculées reçoivent relativement plus de carbone et ce, pendant une période plus longue que les plantes témoins.

Les mesures de fixation d'azote n'ont pas permis de mettre en évidence une fixation supérieure dans le cas des plantes inoculées (1 % de l'azote total), aussi, la réponse à l'inoculation a-t-elle été attribuée à la production de substances de croissance par *Azospirillum brasilense* (TIEN *et al.*, 1979). Cette réalité a été récemment suggérée par OKON et KAPULNIK (1986).

Pour ce qui est du bilan énergétique dans la rhizosphère, il semble évident qu'il n'a pu qu'être amélioré par :

— d'une part, et à long terme, un plus gros apport de matériel racinaire,

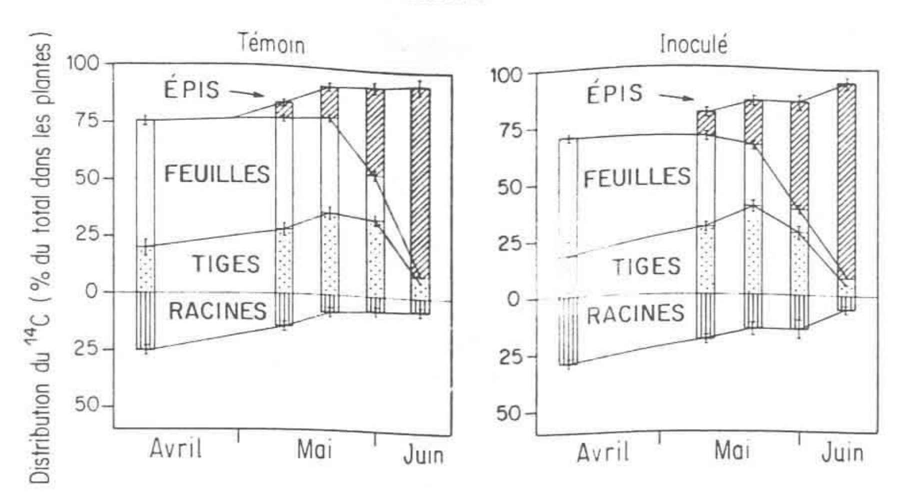


FIG. 3. — Répartition au cours du temps du carbone dans les organes de blé inoculé ou non avec A. b. (WAREMBOURG *et al.*, 1987).

— d'autre part, et à court terme, une libération plus intense de substrat pour la microflore, conséquence d'une plus forte activité racinaire et ce, pendant une période plus longue que chez les plantes non inoculées.

Ce dernier point revêt une importance capitale dans les sols cultivés qui restent nus et par conséquent sans apport de carbone pendant des périodes prolongées. Ces conclusions devraient être confirmées par une expérimentation de terrain, sur plusieurs années, afin de mesurer l'effet, à long terme, de l'inoculation sur le taux de carbone, l'activité microbienne et l'activité globale du sol.

II. — LE RECYCLAGE DU CO_2 RESPIRÉ

L'existence d'autres types de fixation de CO_2 que la photosynthèse est un fait connu depuis longtemps. Cependant, ce qui constituait jusqu'ici une curiosité parallèle, prend à présent plus d'importance à la suite des travaux de CHRISTELLER *et al.* (1977), COKER et SCHUBERT (1981), en raison des quantités importantes de CO_2 fixées par la PEP-carboxylase (Phosphoenolpyruvate carboxylase) des nodosités des légumineuses. Il apparaît cependant que les résultats obtenus jusqu'à présent, sont difficilement comparables en raison des difficultés de mesure. En effet, il s'agit de mesurer, dans un environnement saturé en CO_2 (la rhizosphère), de maintes origines, le recyclage d'une partie infime.

A) **Matériel et méthodes.**

La méthode la plus adaptée, pour mesurer l'activité de fixation de CO_2 par la PEP-carboxylase des nodosités de légumineuses, est celle qui consiste à marquer l'atmosphère qui entoure les racines nodulées, avec du $^{14}CO_2$. Le principe du calcul des quantités

fixées est d'évaluer la quantité de ^{14}C intégrée dans les tissus végétaux et microbiens pour une activité spécifique donnée. Or, le dégagement de CO_2 dilue le $^{14}CO_2$ si bien que cette activité spécifique varie en fonction du temps. Aussi, dans la majeure partie des cas, les mesures ont-elles été effectuées pendant des temps très courts. Afin de pallier à ces difficultés, nous avons mis au point une méthode qui permet de réguler à la fois, la concentration en CO_2, à l'aide d'un analyseur IR, et la radioactivité, à l'aide d'une chambre d'ionisation, comme l'indique le schéma de la figure 4. De cette façon, il est possible de mesurer l'activité fixatrice de CO_2 pendant de longues périodes et ainsi, d'intégrer les variations qui pourraient subvenir, pendant la journée par exemple. De plus, il est possible, tout en maintenant une activité spécifique basse, non perturbante pour les plantes, d'obtenir des indications très précises sur le devenir du carbone recyclé, lorsqu'il se réparti dans les différents organes.

Des mesures préliminaires ont été effectuées sur Lupin (*Lupinus albus* L.).

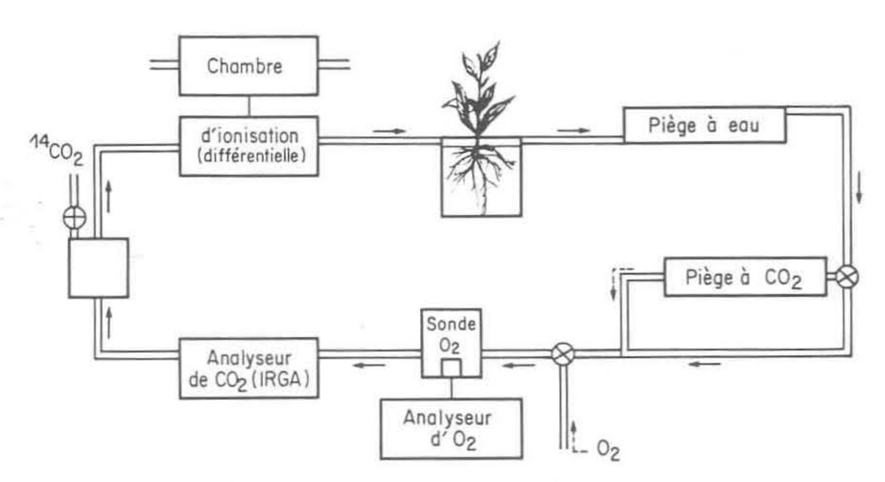


FIG. 4. — Schéma de l'équipement utilisé pour mesurer la fixation de CO_2 par les nodosités de légumineuses.

B) Résultats et discussion.

Les figures 5 et 6 donnent un exemple des résultats obtenus. Les quantités de CO_2 fixé et mesuré dans les plantes, ainsi que les quantités d'azote fixé par les mêmes plantes, pendant un nycthémère, sont représentées par la figure 5. L'on constate une certaine corrélation entre les deux phénomènes. La figure 6 représente l'incorporation du ^{14}C dans les différents organes de lupin en fonction du temps.

On constate que les nodosités perdent progressivement de la radioactivité au profit des organes végétatifs, racines, tiges et feuilles.

En ce qui concerne les quantités absolues de CO_2 recyclé, il convient d'examiner le schéma théorique des principaux rôles de la PEP-carboxylase (Fig. 7), afin de bien comprendre que les quantités mesurées dans les plantes sous-estiment la fixation réelle. En effet, le C recyclé peut emprunter 3 voies différentes :

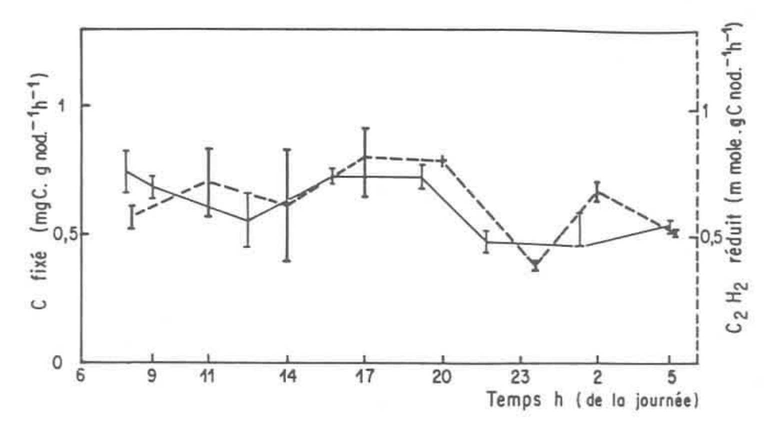


FIG. 5. — Variations nycthémérales de la fixation de CO_2 et de l'activité nitrogénase des nodosités de lupin.

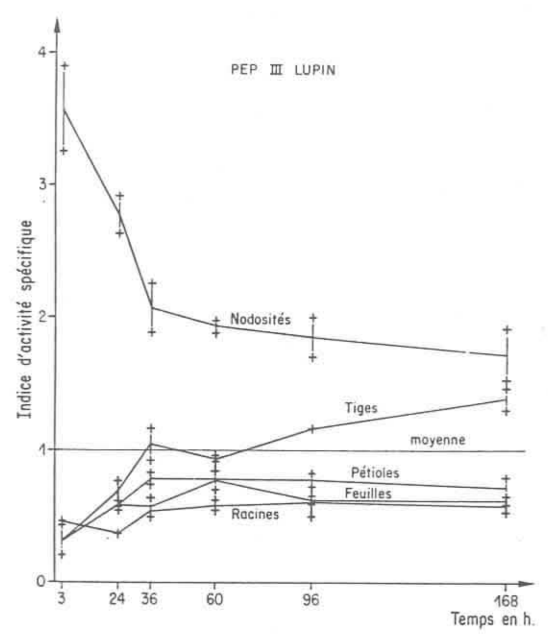


FIG. 6. — Répartition en fonction du temps du carbone fixé par les nodosités de lupin. L'indice d'activité est le rapport entre l'activité spécifique mesurée dans un organe et l'activité spécifique moyenne de la plante entière.

— Il peut servir à alimenter le pool de malate qui contribue au transport des cations.

— Il peut servir de squelette carboné aux acides aminés qui vont exporter l'azote fixé hors des nodosités.

— Il peut servir de substrat énergétique, notamment pour le fonctionnement de la nitrogénase des bactéroïdes.

La plupart des travaux récents (MAXWELL *et al.*, 1984 ; KING *et al.*, 1986) estiment que, au moins 80 % du CO_2 fixé sont perdus par respiration. Or, cette partie est extrêmement difficile à mesurer car elle a court en même temps que le recyclage.

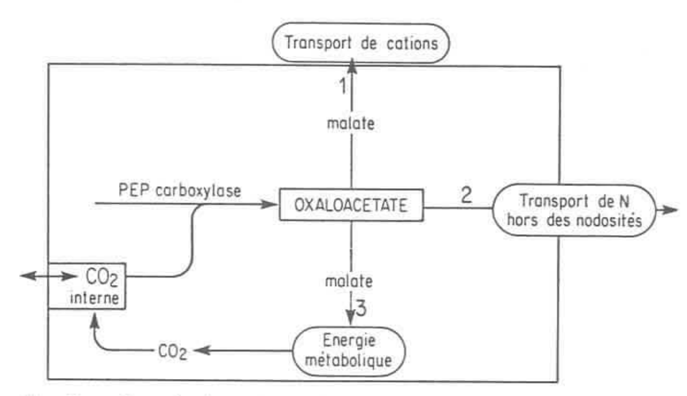


FIG. 7. — Devenir du carbone fixé par les nodosités de légumineuses.

Si l'on veut donc donner une grandeur à la fixation obscure de CO_2, l'on doit avoir recours à certaines données théoriques. Ainsi, si l'on essaye de faire le calcul à partir de nos mesures, ainsi que des mesures obtenues antérieurement (WAREMBOURG *et al.*, 1984), la fixation de CO_2 a atteint l'équivalent de 13 % de la respiration des nodosités. Si l'on sait que, dans certains cas, lorsque la fixation de N_2 est importante, la respiration des nodosités peut atteindre des quantités de carbone équivalentes à celles qui entrent dans les structures racinaires et nodulaires, la fixation de CO_2 peut donc être, dans ces cas là, au moins égale à 13 % de la quantité de carbone qui reste dans ces structures. Ceci constitue un gain non négligeable de carbone qui dépasse de loin les meilleures estimations obtenues pour l'exsudation racinaire. Bien entendu, ce gain est pour la plante et rien ne permet de dire qu'il sera récupéré au niveau de la rhizosphère par une libération équivalente de substrat microbien. Cependant, on peut penser qu'un gain pour la plante se répercutera, plus ou moins directement, et plus ou moins vite, sur le fonctionnement des racines et, par conséquent, sur le statut énergétique de la rhizosphère.

Bien que ce processus, qui découle d'interactions composites atmosphère du sol-microflore-plantes, n'ait pas encore été démontré comme significatif dans la rhizosphère elle-même, le fait de son existence chez les symbiotes permet de l'envisager, car il existe chez de nombreuses bactéries libres anaérobies. Serait-il donc très provocateur d'imaginer que le carbone qui manque toujours pour expliquer l'activité de la microflore du sol, rhizosphérique et non rhizosphérique, et la forte immobilisation d'azote dans la plupart des sols proviendrait de ce type de processus ? De toutes les façons, pour rassurer ceux qui font des mesures de respiration, en aucun cas, celles-ci ne sont compromises par une éventuelle refixation de CO_2 car cette dernière reste relativement faible dans les sols.

III. — CONCLUSION

Ces deux cas précis du rôle évident de la microflore dans le bilan de carbone et, par conséquent d'énergie, des associations plantes-microorganismes ne sont exposés qu'à titre d'exemples. Dans un cas, la microflore produit des hormones de croissance qui favorisent le développement des plantes. Indirectement, à plus ou moins long terme, cela produira une augmentation de substrat microbien. Dans l'autre cas, la microflore symbiotique induit, dans les nodosités, l'existence d'une PEP-carboxylase dont l'activité est très supérieure à celle que l'on peut mesurer dans les racines. Le carbone, recyclé par cette enzyme, contribue pour une grande part à améliorer le coût énergétique de la fixation symbiotique d'azote. L'on a par conséquent la démonstration évidente d'une réciprocité bénéfique dans ces interactions plantes-microorganismes, même pour l'allocation en énergie, généralement associée aux plantes seules, la microflore en étant tributaire. Dans les deux exemples, ce statut est amélioré par l'association, et les deux partenaires en bénéficient. Nul doute qu'il existe beaucoup d'autres processus de ce type qu'il reste à élucider, afin de mieux saisir les avantages, voire même la nécessité de telles associations.

Remerciements

Les auteurs remercient M[me] Lafont pour son assistance technique.

Résumé

Dans l'environnement complexe que constitue la rhizosphère, le fait le moins contesté est que le statut énergétique est garanti par les plantes qui, par l'intermédiaire de leurs racines, libèrent en permanence des composés carbonés (exsudation et rhizodéposition). Mis à part le fait que l'activité de la microflore associée aux racines dépende de ces composés, ce qui est mal connu c'est le rôle que celle-ci peut avoir sur ce statut énergétique. Deux exemples précis permettent de le mettre en évidence :

— la production d'hormones de croissance par *Azospirillum brasilense* qui, en favorisant la croissance des racines, contribue par là même à augmenter l'apport de carbone dans la rhizosphère,

— le recyclage du CO_2 de l'atmosphère du sol par une PEP-carboxylase des nodosités de légumineuses qui contribue à améliorer le bilan carboné des plantes et celui de leur rhizosphère.

Ces interactions, microflore-plante dans un cas, milieu physique (atmosphère du sol)-microflore-plante dans l'autre, sont-elles la règle générale et si oui, qu'elles en peuvent être les répercussions au point de vue de l'activité biologique, de l'évolution et de la fertilité des sols ?

SUMMARY

In the complex environment of the rhizosphere, energy is provided by the plants which permanently liberate carbon compounds by their roots (exudation and rhizo-deposition). Beside the fact that the associated microflora consumes this energy, its role on the energetic status of the soil is not well known. Two specific examples are exposed in order to show its possible effect.

— the production of growth promoting substances by *Azospirillum brasilense* which, in enhancing root growth, increases the carbon supply to the rhizosphere,

— the recycling of CO_2 from the soil atmosphere by the PEP-carboxylase of legumes nodules, which contribute to improve the carbon economy of the plants and hence of the rhizosphere.

Are these interactions: microflora-plant for one, soil atmosphere-microflora-plant for the other, a general rule and, in this case, what are the consequences for the biological activity, the dynamics and the fertility of the soil?

RÉFÉRENCES

BARBER (D. A.) & MARTIN (J. K.), 1976. — The release of organic substances by cereal roots in soil. *New Phytologist*, **76**: 69-80.

CHRISTELLER (J. T.), LAING (W. A.) & SUTTON (W. D.), 1977. — Carbone dioxide fixation by lupin nodules. I Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol.*, **60**: 47-50.

COKER (G. T.) & SCHUBERT (K. R.), 1981. — Carbone dioxide fixation in soybean roots and nodules. I. Characterization and comparison with N_2 fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. *Plant Physiol.*, **67**: 691-696.

KING (B. J.), LAYZELL (D. B.) & CANVIN (D. T.), 1986. — The role of dark carbon dioxide fixation in roots and nodules of soybean. *Plant Physiol.*, **81**: 200-205.

MAXWELL (C. A.), VANCE (C. P.), HEICHEL (G. H.) & STADE (S.), 1984. — CO_2 fixation in alfalfa and birdfoot trefoil root nodules and partitioning of ^{14}C to the plant. *Crop Sci.*, **24**: 257-264.

OKON (Y.), KAPULNIK (Y.), 1986. — Development and function of Azospirillum inoculated roots. *Plant and Soil*, **90**: 3-16.

ROVIRA (A. D.), FOSTER (R. C.) & MARTIN (J. K.), 1979. — *Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: The Soil-Root Interface* (Ed. J. C. Harley and R. S. Russell), Academic Press, London, pp. 1-4.

TIEN (T.), GASKINS (M. H.) & HUBBELL (D. H.), 1979. — Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pear millet (*Pennicetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 1016-1024.

WAREMBOURG (F. R.), 1983. — Estimating the true cost of dinitrogen fixation by nodulated plants in undisturbed conditions. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 930-937.

WAREMBOURG (F. R.) & BILLES (G.), 1979. — *Estimating carbon transfers in the plant rhizosphere. In: The Soil-Root Interface* (Ed. J. C. Harley and R. S. Russell), Academic Press, London, pp. 183-196.

WAREMBOURG (F. R.), DREESSEN (R.), VLASSAK (K.) & LAFONT (F.), 1987. — Peculiar effect of *Azospirillum inoculation* on growth and nitrogen balance of winter wheat. *Biol. Fert. Soils*, **4**: 55-59.

WAREMBOURG (F. R.), HAEGEL (B.), FERNANDEZ (M. P.) & MONTANGE (D.), 1984. — Distribution et utilisation des assimilats carbonés en relation avec la fixation symbiotique d'azote chez le soja (*Glycine max* L. Merrill). *Plant and soil*, **82**: 163-178.